



Title	Analysis of Nuclear Localization of Laminin Binding Protein Precursor p40 (LBP/p40)
Author(s)	佐藤, 学
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40073
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	佐藤	まなぶ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	第12992号	
学位授与年月日	平成9年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻	
学位論文名	Analysis of Nuclear Localization of Laminin Binding Protein Precursor P40 (LBP/P40) (ラミニン結合蛋白前駆体 P40 (LBP/P40) の核局在の解析)	
論文審査委員	(主査) 教授 田中亀代次	
	(副査) 教授 花岡文雄 教授 木下タロウ	

論文内容の要旨

【目的】

我々の研究室ではラット肝の核画分を免疫源として、核膜及び染色体の構築に関与していると考えられるタンパク質を認識する、多数のモノクローナル抗体を作製した (Wataya-Kaneda et. al. *J. Cell Biol.*, 104, 1 (1987))。その内の1つとして得られたM108 (マウス IgM) の抗原 P40は染色体周囲領域、核膜周囲領域のみならず細胞質内顆粒に存在し、二次元電気泳動法による比較などからそれらは同一のタンパク質であると推定された。特に核膜の P40は免疫電顕法による観察並びに細胞分画法による溶出条件などから核膜とクロマチンを結ぶリガンド蛋白質としての機能が推測された (Kaneda et. al. *J. Cell Sci.*, 106, 741 (1993))。本研究では細胞質 P40を同定し、さらにその遺伝子産物の核内での存在を検証し、その存在様式を解析した。

【方法ならびに成績】

P40の一次構造を決定するためエールリッヒ腹水癌細胞を材料として用い、超遠心法及び陰イオン交換樹脂、ゲルろ過等のカラムクロマトグラフィー (FPLC) を組み合わせることにより細胞質 P40の精製を行った。ペプチドシーケンスを行った結果、細胞質の P40はラミニン結合タンパク P67 (LBP/P67) の前駆体と考えられている LBP/P40であることが明らかとなった。LBP/P40は細胞質内に於て40Sリボソームに局在することが知られていたが核の局在についての報告は現在までなく、次にLBP/P40がM108の抗原であることを確認すること、並びにLBP/P40の核の局在について検討した。GenBankに登録されているヒトの LBP/P40遺伝子の配列からプライマーを設計し、LBP/P40の cDNA を HeLa 細胞の cDNA ライブラリーから PCR 法により増幅した。配列中に変異等がないことをシーケンスにより確認後、発現ベクター (pET21) に組み込み、大腸菌に導入し組み換え蛋白を作らせたところ、その生成物はイムノプロット法に於いて約40kDa のバンドとしてM108により認識され、LBP/P40はM108の抗原となりうることを確認した。続いて内在性の P40と区別するため c-myc, T7等のエピトープタグを付けた LBP/P40遺伝子を発現ベクター (pcDNA3) に組み込み HEL, BHK, COS-7, CHO 等の培養細胞内で発現させた。抗 c-myc tag 抗体を用いて蛍光抗体法を行ったところ、コントロールの DNA (c-myc- pcDNA3) を導入した細胞では全くシグナルが観察されないのに対し、c-myc-LBP/P40遺伝子が導入され発現していると考えられる細胞に於て小胞体様の網目状のシグナルが細胞質内に観察されるのみならず、核においてもシグナルが認められた。次

にT 7-LBP/P 40を発現する stable transformantを作成し、上記の観察結果を生化学的に解析した。ショ糖密度勾配遠心法により分画したところ細胞質のT 7-LBP/P 40は40Sリボソームに一致した画分に存在し、細胞質内で正しくソーティングされていることを確認した。この stable transformant の核内のT 7-LBP/P 40の溶出条件を調べたところ、DNase I処理、150mM 塩処理では溶出されず、500mM 塩及び2% NP40の処理により溶出され、以前我々が示したM108により認識される核膜のP 40の溶出条件と一致した。

【総括】

以上の結果から核及び細胞質に存在するM108の抗原P 40はLBP/P 40であることが確認された。またLBP/P 40は細胞質内に存在するのみならず、核に於いて核構造に強固に結合していることが明らかとなった。1つの細胞内で同一のポリペプチドが異なる3箇所（リボソーム、核膜、LBP/P 67として細胞表面）に存在することは非常にユニークであるといえ、今後、各々の箇所へのソーティングの機構、また各々の箇所での機能さらにはLBP/P 40蛋白の制御等の解析が必要とされる。

論文審査の結果の要旨

M108は当研究室で得られたモノクローナル抗体で、その抗原P 40は分裂期の染色体周囲および分裂間期の核膜周囲に局在するのみならず細胞質内にも存在し、この分子の解析により核及び染色体の構築機構を細胞質側の因子から解明し得るものと考えられた。本研究では細胞質由来のP 40を同定し、さらにその遺伝子産物の核内での存在を検証し、その存在様式を解析した。

細胞質P 40を精製後ペプチドシーケンスを行った結果、ラミニン結合タンパクP 67（LBP/P 67）の前駆体と考えられているLBP/P 40であることを明らかにした。LBP/P 40は細胞質内に於て40Sリボソーム上に存在することは知られていたが、核の局在についての報告は本研究までになく、次にLBP/P 40の核の局在についてエピトープタグ法を用いることにより解析した。その結果、蛍光抗体法に於いて核内にシグナルが観察され、また生化学的に核からの抽出条件を調べたところ、高濃度塩及び界面活性剤処理が必要とされ、核構造に強固に結合していることを明らかにした。

以上の研究成果は核への局在が知られていなかったLBP/P 40が核構築に関与する可能性を示唆するもので、高等真核生物に於ける核構造の解明に向け重要な知見をもたらした。また1つの細胞内で同一のポリペプチドが異なる3箇所（リボソーム、核膜、LBP/P 67として細胞表面）に存在することを示した点で蛋白質のソーティング機構の面からも非常に興味深い知見をもたらした。よって本研究は学位を授与するに値すると考えられる。